



Universidade de Aveiro Departamento de Biologia
Ano 2011

**Helena Maria Teixeira
dos Santos Ferreira**

**A IMPORTÂNCIA DAS ECTOFOSFATASES NA
PATOGENICIDADE DE *CANDIDA ALBICANS***



Universidade de Aveiro Departamento de Biologia
Ano 2011

**Helena Maria Teixeira
dos Santos Ferreira**

A IMPORTÂNCIA DAS ECTOFOSFATASES NA PATOGENICIDADE DE *CANDIDA ALBICANS*

Dissertação apresentada à Universidade de Aveiro para cumprimento dos requisitos necessários à obtenção do grau de Mestre em Microbiologia, realizada sob a orientação científica da Prof.^a Doutora Teresa Gonçalves, Professora Auxiliar da Faculdade de Medicina da Universidade de Coimbra, e co-orientação científica da Prof.^a. Doutora Etelvina Maria de Almeida Paula Figueira, Professora Auxiliar do Departamento de Biologia da Universidade de Aveiro.

Dedico este trabalho a minha família. Aos meus pais e sogros pelo apoio que me deram. Ao meu marido Rui e aos meus filhos Beatriz e João pelo carinho e energia positiva que sempre me transmitiram.

O júri

Presidente

Prof. Doutora Maria Ângela Sousa Dias Alves Cunha
Professora Auxiliar do Departamento de Biologia da Universidade de Aveiro

Prof. Doutora Isabel Alexandra Marcos Miranda
Investigadora Auxiliar da Faculdade de Medicina da Universidade do Porto

Prof. Doutora Teresa Maria Fonseca Oliveira Gonçalves
Professora Auxiliar da Faculdade de Medicina da Universidade de Coimbra

Prof. Doutora Etelvina Maria de Almeida Paula Figueira
Professora Auxiliar do Departamento de Biologia da Universidade de Aveiro

Agradecimentos

Quero agradecer a Prof. Doutora Teresa Gonçalves, minha orientadora pela amizade e carinho com que sempre me recebeu, por me ter aberto as portas para a realização deste trabalho, pelos conhecimentos, disponibilidade e apoio que me dedicou.

A Prof. Doutora Etelvina minha co-orientadora pelas orientações técnicas e pedagógicas, pela disponibilidade, sugestões e simpatia na realização desta dissertação.

A todos os que colaboraram comigo no Laboratório de Microbiologia da Faculdade de Medicina de Coimbra, pela sua paciência e disponibilidade, o meu muito obrigado.

A todos os colegas no laboratório de Microbiologia do Centro Hospitalar de Coimbra pelo apoio, ajuda e carinho que me deram.

A minha prima São, pelas “dicas” que me deu no início deste trabalho e por toda a ajuda.

Ao Daniel pela ajuda no tratamento dos dados.

Agradeço também aos meus Pais pelo apoio.

Aos amigos pela simpatia e força positiva.

Não poderia deixar de agradecer ao meu marido pela ajuda e disponibilidade total que sempre teve.

Aos meus filhos Beatriz e João pelo amor e carinho incondicional.

palavras-chave

Ectofosfatases; *Candida albicans*; Factores de Virulência

resumo

Os fungos são ubíquos no ambiente e fazem parte da flora humana. Muitos fungos do género *Candida* são patogénicos oportunistas e causam infecções em indivíduos imunodeprimidos ou com alterações do sistema imunitário. A gravidade da infecção é determinada pela virulência do agente e pela sua capacidade de escapar às defesas imunitárias do hospedeiro.

O incremento das infecções fúngicas nas últimas décadas levou a um aumento do interesse no estudo dos fungos. A candidíase é a infecção fúngica mais frequente no homem sendo causada por fungos do género *Candida*.

A *Candida albicans* é um fungo polimórfico podendo apresentar-se sob a forma de levedura ou filamentosa com uma parede celular altamente organizada. Os factores de virulência mais importantes são: a produção de enzimas, a capacidade de adesão aos epitélios, a produção de biofilmes e a resistência à fagocitose. Pensa-se que a produção de ectofosfatases também é um factor importante na instalação da infecção fúngica.

Este trabalho teve como objectivo estudar a actividade de ectofosfatases em isolados clínicos de *C. albicans*, “*in vitro*”, comparando a actividade intrínseca das ectofosfatases destas estirpes com o fenótipo invasivo, de acordo com o local de infecção (local ou sistémica).

As estirpes foram seleccionadas a partir de uma colecção de estirpes patogénicas. Foram seleccionadas 33 estirpes de origens diversas: 13 de líquidos estéreis (bílis, líquido peritoneal, pleural, abdominal, ascítico), 8 de sangue, 4 isolados de pontas de cateter, 3 de urina, 3 de exsudados vaginais e 2 de fezes.

A actividade enzimática foi quantificada em três condições: 30°C e 37°C em meio YPD e a 37°C com o meio RPMI 1640 suplementado com 10% de soro fetal bovino inactivado, 23,8 mM de bicarbonato de sódio e 50 mM de glicose. A medição da actividade enzimática da ectofosfatase foi feita utilizando o método descrito por Kiffer-Moreira e colaboradores (2007), usando o Kit de quantificação de fosfatases ácidas (“Acid Phosphatase Assay Kit” - Sigma).

Os valores médios de actividade enzimática obtidos em estirpes isoladas de sangue foram de 0,007 U/10⁷cel. Em estirpes isoladas de outros locais de infecção o valor médio foi de 0,002 U/10⁷cel, este valor aumenta quando temos patologias oncológicas associadas a baixa competência imunitária.

Conclui-se que o valor de actividade das ectofosfatases está dependente das condições de imunidade do hospedeiro e do local de instalação da infecção. Os valores mais elevados foram apresentados por estirpes isoladas a partir do sangue, em que os doentes apresentavam um sistema imunitário deprimido, devido à patologia de origem oncológica.

keywords

Ectophosphatases; *Candida albicans*; Virulence Factors

abstract

Fungi are ubiquitous in the environment and are part of human flora. Many fungi of the genus *Candida* are opportunistic pathogens and cause infections in immunocompromised individuals or with altered immune system. The severity of infection is determined by the virulence of the agent and its ability to evade host immune defenses.

The increase of fungal infections in recent decades has led to increased interest in the study of fungi. Candidiasis is the most common fungal infection in humans, being caused by fungi of the genus *Candida*.

Candida albicans is a dimorphic fungus that can present itself in the form of yeast or filamentous with a cell wall highly organized. The most important virulence factors are: the production of enzymes, the ability to adhere to epithelia, the biofilm production and the resistance to phagocytosis. It is thought that the production of ectophosphatases is also an important factor in setting up the fungal infection.

This work aimed to study the activity of ectophosphatases in clinical isolates of *C. albicans* in vitro by comparing the intrinsic ectophosphatase activity of these strains with invasive phenotype, according to the site of infection (local or systemic).

The 33 strains used in this study were selected from a collection of pathogenic strains: 13 from sterile fluids (bile, peritoneal fluid, pleural, abdominal and ascitic), 8 from blood, 4 from catheter tip, 3 from urine, 3 from vaginal swabs and 2 from feces.

The enzyme activity was measured in three conditions: 30°C and 37°C in the medium YPD and at 37°C with RPMI 1640 supplemented with 10% fetal bovine serum inactivated, 23.8 mM sodium bicarbonate and 50 mM glucose.

Measurement of ectophosphatases activity was made using the method described by Kiffer-Moreira et al (2007), using the Acid Phosphatase Assay Kit (Sigma).

The mean values of enzymatic activity obtained in strains isolated from blood were 0.007 U/10⁷ cells. In strains isolated from other infection sites the average value is 0.002 U/10⁷ cells, this value is increased when there are extensive malignancies associated with a low immune competence.

It is concluded that the value of ectophosphatases activity is dependent on the host immunity conditions and the site of infection. The highest values were obtained for strains isolated from the blood, in which patients had a depressed immune system because of their oncologic pathology.

ÍNDICE

ÍNDICE DE TABELAS.....	3
LISTA DE SIGLAS E ABREVIATURA	4
INTRODUÇÃO.....	5
1) INFECÇÕES POR <i>CANDIDA SPP.</i> EM PARTICULAR POR <i>C. ALBICANS</i>.....	6
2) CARACTERÍSTICAS DA <i>C. ALBICANS</i>.....	7
2.1) CARACTERÍSTICAS BIOLÓGICAS	7
2.2) FACTORES DE VIRULÊNCIA.....	8
2.2.1) PRODUÇÃO DE ENZIMAS	8
2.2.2) CAPACIDADE DE ADESÃO E PRODUÇÃO DE BIOFILME	9
2.2.3) RESISTÊNCIA A FAGOCITOSE	10
2.3) FOSFATASES.....	12
2.3.1) ECTOFOSFATASES.....	13
3) OBJECTIVO DO ESTUDO	16
II- MATERIAL E MÉTODOS	17
1) DEFINIÇÃO DO OBJECTO DE ESTUDO.....	17
2) MATERIAIS E MÉTODOS.....	17
2.1) ESTIRPES E SUA PROVENIÊNCIA	17
2.1.1) MEIOS DE CULTURA E SOLUÇÕES.....	17
2.1.2) CONDIÇÕES DE CRESCIMENTO.....	18
2.2) MEDIÇÃO DA ACTIVIDADE ENZIMÁTICA DA ECTOFOSFATASE.....	18
2.3) TRATAMENTO DE DADOS.....	19
1) RESULTADOS	19
3.1) CARACTERIZAÇÃO DA AMOSTRA	20
3.1.1) PROVENIÊNCIA DAS ESTIRPES.....	20
As estirpes estudadas, foram caracterizadas utilizando o número destas na colecção de fungos patogénicos, indicando o produto de origem, a idade e a informação clínica de acordo com a tabela nº1.....	20
3.1.2) IDADE	21
3.1.3) GÉNERO.....	21
3.1.5 FACTORES DE RISCO/PATOLOGIA DE BASE	22
3.2) ACTIVIDADE ENZIMÁTICA DA ECTOFOSFATASE	23
3.2.1) IDADE	24
3.2.2) GÉNERO.....	24

3.2.4) FACTORES DE RISCO (PATOLOGIA DE BASE OU CONDIÇÃO FISIOLÓGICA).....	25
DISCUSSÃO.....	26
CONCLUSÃO.....	29
BIBLIOGRAFIA.....	30

ÍNDICE DE FIGURAS

FIGURA Nº 1: DISTRIBUIÇÃO DO Nº DE ESTIRPES POR ESCALÕES ETÁRIOS	21
FIGURA Nº 2: DISTRIBUIÇÃO DE ESTIRPES POR GÉNERO DE DOENTE.	21
FIGURA Nº 3: A PERCENTAGEM DE ESTIRPES POR PRODUTO	22
FIGURA Nº 4: A PERCENTAGEM DE ESTIRPES POR PATOLOGIA	22
FIGURA Nº 5: DETERMINAÇÃO DA ACTIVIDADE DA ECTOFOSFATASE. A) SANGUE. B) LÍQUIDOS; C) EXSUDADOS VAGINAIS; D) URINAS; E) FEZES;.....	23
FIGURA Nº 6: VALORES MÉDIOS DE ACTIVIDADE DE ECTOFOSFATASE POR ESCALÃO ETÁRIO E DESVIO PADRÃO.	24
FIGURA Nº 7: MÉDIAS DE ACTIVIDADE DA ECTOFOSFATASE POR SEXO E POR CONDIÇÃO DE TESTE.	24
FIGURA Nº 8: DISTRIBUIÇÃO DAS MÉDIAS DE ACTIVIDADE DE ECTOFOSFATASE PARA CADA CONDIÇÃO TESTE POR PRODUTO E DESVIO PADRÃO	25
FIGURA Nº 9: MEDIA DA ACTIVIDADE DE ECTOFOSFATASE POR PATOLOGIA E DESVIOS PADRÃO.....	25

ÍNDICE DE TABELAS

TABELA I: CARACTERIZAÇÃO DAS ESTIRPES EM ESTUDO	20
--	----

LISTA DE SIGLAS E ABREVIATURA

Als	Aglutinine-like sequence
BCG	Bacillus Calmette-Guérin
CHC	Cento Hospitalar de Coimbra
CLR	C-Type Lectin
FBS	Fetal Bovine Serum
FMC	Faculdade de Medicina de Coimbra
HUC	Hospitais da Universidade de Coimbra
HWP1	Hyphal Wall Protein-1
IACS	Infecção Associada aos Cuidados de Saúde
IFN- γ	Interferon Gama
IL	Interleucinas
ITU	Infecção do Trato Urinário
NaOH	Hidróxido de Sódio
NO	Oxido Nítrico
O₂	Oxigénio
P/V	Peso /Volume
PAMPs	Pathogen-Associated Molecular Patterns
PBS	Phosphate Buffered Saline
Pho	Orthophosphate Carrier Genes
PRRs	Pattern-Recognition Receptors
PVC	Polyvinyl Chloride
rpm	Rotacções por minuto
Rv	Gene Retroviral
Sap	Secreted aspartyl proteases
Th1	T-helper cell type 1
Th2	T- helper cell type 2
TLRs	Toll-Like Receptors
TRH	Transplante Hepatico
U	Unidades de actividade enzimática
UCI	Unidades de Cuidados Intensivos
UCIP	Unidades de Cuidados Intensivos Pediátricas
YopH	Tirosina fosfatase
YPD	Yeast Extract Peptone Dextrose

INTRODUÇÃO

Os fungos, em particular as leveduras, são organismos unicelulares e fazem parte da flora normal humana. Os fungos patogênicos são invariavelmente ubíquos e frequentemente colonizam o hospedeiro. Em circunstâncias normais esta colonização é inofensiva e apresenta uma baixa virulência. No entanto em certas situações, nomeadamente quando o sistema imunitário se encontra enfraquecido, tornam-se patogênicos.

No género *Candida* incluem-se aproximadamente 200 espécies diferentes, com habitats muito diversificados, incluindo no homem, onde podem fazer parte das floras normais de diversas regiões do corpo como a cavidade oral, a orofaringe, o aparelho urinário inferior ou o aparelho intestinal.

A maioria dos fungos do género *Candida* é oportunista e causa infecção em indivíduos com imunodeficiência ou com o sistema imunitário enfraquecido. Em indivíduos imunocompetentes, é frequente encontrar colonização assintomática de fungos na pele e mucosas (Paulo *et al.*, 2009).

Os fungos são frequentemente isolados de amostras clínicas, sendo por vezes difícil determinar se o fungo está a colonizar ou a causar infecção. A candidíase é a infecção fúngica mais frequente no homem, causada por leveduras do género *Candida*. O agente etiológico mais comum da candidíase é a *Candida albicans*, no entanto *Candida parapsilosis*, *Candida krusei*, *Candida lusitanae*, *Candida glabrata* e *Candida tropicalis* são agentes patogênicos emergentes.

A infecção por leveduras pode ter características muito diferentes, podendo ir desde uma simples colonização das mucosas até quadros sistémicos com invasão de órgãos, expressando assim a variedade de relações que podem ocorrer entre o hospedeiro e o agente. A origem das infecções por leveduras pode ser exógena ou endógena.

1) INFECÇÕES POR CANDIDA SPP. EM PARTICULAR POR C. albicans

O grande aumento de infecções nosocomiais fúngicas nas últimas duas décadas levou a um aumento do interesse nesta área. Num estudo realizado em Portugal os fungos representam a quarta causa de septicemia, correspondendo a 3,5% dos microrganismos isolados em culturas de sangue, com uma incidência de casos de fungemia de 2,7 por 1000 admissões com um ratio de 39,2% e a uma mortalidade associada de 39,3% sendo superior ao descrito por estudos feitos nos Estados Unidos e na Europa. Segundo o mesmo estudo verificou-se que *C. albicans* é o agente que mais infecções fúngicas causa, o que pode ser explicado pela natureza endógena das infecções que provoca (Costa-de-Oliveira *et al*, 2008).

C. albicans é habitualmente um comensal inofensivo em hospedeiros normais, contudo em doentes imunodeprimidos ou imonossuprimidos a candidíase invasiva pode por em risco a vida do doente. *Candida spp* e *C. albicans* em particular são uma das principais causas de infecção associada aos cuidados de saúde (IACS), podendo causar peritonite fúngica fatal em doentes submetidos a diálise peritoneal (Vilanova *et al.*, 2004). Actualmente os fungos apresentam-se como a quarta e terceira causa de infecções sanguíneas e urinárias respectivamente, associadas aos cuidados de Saúde (Vediyappan *et al*, 2010).

Em doentes não neutropénicos em estado crítico internados em Unidades de Cuidados Intensivos (UCI) podem ocorrer infecções invasivas por *Candida spp* e estas podem ser locais ou sistémicas. A ocorrência destes quadros clínicos está relacionada com as características e circunstâncias que levaram o doente a UCI (Garcia, 2006). Estas características ou factores de risco são: a presença de colonização, o uso de antibióticos de largo espectro, o uso de corticosteróides, a existência de cateter central ou alimentação parentérica, cirurgia abdominal, perfuração do tubo digestivo, falha renal e pontuação Apache II elevada. Consoante o tipo e o número de factores presentes é possível identificar os pacientes aos quais se deve pedir provas laboratoriais dirigidas para o diagnóstico de infecção invasora por *Candida spp* e iniciar tratamento antifúngico empírico precocemente (Garcia, 2006).

As espécies de *Candida* são a primeira causa de infecções invasivas por fungos em crianças hospitalizadas e a terceira mais frequente em infecções sanguíneas associadas a cuidados de saúde em casos pediátricos nos Estados Unidos. A candidemia está frequentemente associada a sinais e sintomas de septicemia. As infecções fúngicas têm o segundo maior índice de fatalidade em casos de sepsis em crianças. Verificou-se que em Unidades de Cuidados Intensivos Pediátricas (UCIP), a presença de cateter

venoso central, o diagnóstico de patologia oncológica maligna e a terapêutica com Vancomicina ou outros antimicrobianos com actividade contra bactérias anaeróbias durante mais de 3 dias, estavam directamente associado ao desenvolvimento de candidémia. Crianças na UCIP, com 3 ou mais destes factores de risco em diferentes combinações têm entre 10% a 46% de probabilidade de desenvolverem candidémia. A presença de cateter venoso central apresenta-se como um dos factores com maior importância, sugerindo que este pode ser a fonte de candidémia nesta população. Doentes com doença neoplásica têm um claro aumento de risco de candidémia, devido ao seu estado de depressão do sistema imunitário, e ao facto de apresentarem alterações das mucosas gastrointestinais resultantes da acção de fármacos quimioterápicos citotóxicos e alteração da flora intestinal pela acção da terapêutica antimicrobiana, o que cria condições para que as leveduras invadam a circulação mesentérica (Zaoutis *et al*, 2010).

Um estudo na Austrália mostrou que a candidémia ocorre mais frequentemente em recém-nascidos. A candidémia neonatal e pediátrica estão associadas a complicações em recém-nascidos e a crianças com cancro. A mortalidade é significativamente mais baixa, do que em adultos. Verificou-se a predominância de *C. albicans* e *C. parapsilosis* com um perfil de susceptibilidade favorável à continuação da utilização de fluconazol e anfotericina B para o seu tratamento (Blyth *et al*, 2009).

2) CARACTERÍSTICAS DA *C. albicans*

2.1) CARACTERÍSTICAS BIOLÓGICAS

Os fungos são organismos Eucariotas, podendo ser unicelulares ou pluricelulares. O género *Candida* pertence a família Cryptococcaceae da classe Ascomycetes e filo Ascomycota, que se caracteriza por leveduras que apresentam formas arredondadas ou ovais que medem aproximadamente 2,0 a 4,0 µm. Os esporos morfologicamente semelhantes à célula mãe formam-se por gemulação, designando-se blastósporos (Portela, 2006).

A parede celular é, altamente organizada, sendo determinante para a forma e viabilidade dos fungos. A sua estrutura é composta por um esqueleto de fibrilhas polisacáridicas compostas por β - (1,3) -glucano que está covalentemente ligado a β - (1,6) -glucano e quitina (β - (1,4) – polímeros de N-acetil glicosamina) formando a estrutura base de suporte de uma camada de proteínas externas glicosiladas também chamados de manoproteínas (Veerdonk *et al*, 2008).

C. albicans é um fungo polimórfico que se apresenta sob a forma leveduriforme no estado saprofítico, estando mais associado à colonização assintomática mas que pode também causar doença, ou sob a forma filamentosa, pseudo-hifas e/ou hifas verdadeiras, observados em processos patogénicos, sendo considerado que esta forma é necessária para invadir tecidos mais profundos. Além disso, em condições subóptimas de crescimento, pode ocorrer a formação de clamidósporos (esporos que possuem uma espessa parede celular). Desta forma o fungo tem capacidade para se adaptar a diferentes nichos biológicos podendo ser considerado um organismo pleomórfico (Álvares *et al*, 2007).

2.2) FACTORES DE VIRULÊNCIA

A virulência de um microrganismo é definida como a capacidade deste causar doença. Esta terá maior ou menor expressão, dependendo da inter-relação entre o agente e o hospedeiro (Portela, 2006).

Um agente de elevada patogenicidade é aquele que é capaz de sobreviver e ultrapassar o sistema imunológico do hospedeiro, utilizando estratégias que lhe permitem passar despercebido pelas defesas do hospedeiro e eventualmente causar doença em pacientes de risco. Compreender estes mecanismos de evasão ao sistema imunitário, pode contribuir para o desenvolvimento de novas estratégias terapêuticas contra as infecções fúngicas. (Chai *et al.*, 2009).

São vários os factores de virulência: produção de enzimas, capacidade de adesão e produção de biofilmes, resistência a fagocitose. Em particular, a capacidade de produção de enzimas que é o objecto de estudo deste trabalho.

2.2.1) PRODUÇÃO DE ENZIMAS

As estirpes invasivas de *C. albicans* produzem significativamente mais enzimas com actividade extra celular do que estirpes comensais (Gokce *et al*, 2007).

As enzimas hidrolíticas extracelulares parecem desempenhar um papel importante no aumento do crescimento de *C. albicans*, facilitando a aderência e a penetração nos tecidos, favorecendo assim a invasão do hospedeiro (Tsang *et al*, 2007).

Um dos factores de virulência mais estudados em *C. albicans* isolada de indivíduos com HIV são as enzimas responsáveis pela aderência às células epiteliais da boca e a influência destas no sistema imunitário das mucosas – “salivary secreted leukocyte protease inhibitor” (Portela *et al*, 2010).

A produção de proteases aspárticas (Sap) é um dos principais mecanismos de virulência de *C. albicans*. Estas enzimas têm um papel importante na degradação dos

componentes da mucosa como o colagénio, a queratina e a mucina assim como nos componentes do sistema imunitário, como citocinas, anticorpos e complemento, facilitando desta forma, a invasão dos tecidos do hospedeiro (Ombrella *et al*, 2008). Verificou-se que isolados de *C. albicans* obtidos a partir de hospedeiros imunocompetentes, expressam altos níveis de actividade de Sap, e que leveduras mutantes e deficientes em Sap apresentam uma menor virulência do que as estirpes normais. As proteínas Sap são codificadas por uma família de, pelo menos, 10 genes que regulam vários estágios de infecção (Vilanova *et al*, 2004). A Sap 1 e a Sap 6 participam na adesão, na destruição dos tecidos e na evasão à resposta imune do hospedeiro. O papel da Sap 7 e da Sap 10 não é ainda muito claro, mas é evidente que a Sap 9 e a Sap 10 não são formas excretadas pela célula, sendo no entanto proteinases reguladoras com um papel na manutenção da integridade da superfície celular (Tsang *et al*, 2007).

As fosfolipases são um grupo heterogéneo de enzimas com capacidade para hidrolizar os glicerofosfolípidos, reconhecidas como factores de virulência em fungos, cumprindo um papel importante na destruição das membranas das células do epitélio, facilitando a penetração da fase de hifa nas mesmas (Ombrella *et al*, 2008).

2.2.2) CAPACIDADE DE ADESÃO E PRODUÇÃO DE BIOFILME

A pele e as mucosas são uma barreira anatómica contra fungos, como *Candida spp.* O sucesso da invasão e colonização requer da parte destes, meios de aderência a superfície dos epitélios. Para contrariar a acção protectora dos cílios das mucosas, a *Candida spp.* expressa factores de ligação chamados adesinas, proteínas de superfície que se ligam covalentemente ao β -glucano da parede celular ajudando a promover a adesão a superfície epitelial (Chai *et al*, 2009).

As adesinas designadas como “aglutinine-like sequence” (Als) e “Hyphal Wall Protein-1” (HWP1) participam na formação do biofilme facilitando a aderência célula-superfície e célula-célula (Chai *et al*, 2009). As proteínas de superfície Als1 e Als3 são necessárias para a formação do biofilme *in vivo*. A proteína de HWP1 promove directamente a interacção entre as células de superfície de *C. albicans* e está substancialmente aumentada na presença das proteínas de superfície Als1e Als3 (Nobile *et al*, 2008).

A formação do biofilme em material médico implantado está associado a infecções sanguíneas e estes causam mais de 10 milhões de infecções por ano nos Estados Unidos (Nobile *et al*, 2008).

A aplicação de cateteres venosos centrais cria portas de entrada de microrganismos, devido à quebra de continuidade da superfície epitelial. A formação do biofilme nes-

tes locais actua como uma barreira aos antimicrobianos, permitindo a sobrevivência e adaptação genética da *Candida spp.* (Chai, et al 2009).

O biofilme é formado por uma complexa estrutura tridimensional organizada de hifas e uma matriz exopolimérica, que contem uma mistura de fungos, hifas e pseudo-hifas (LaFleur *et al*, 2006).

Quando cresce “*in vitro*” em discos de PVC, o biofilme formado por *C. albicans* apresenta duas camadas: uma basal que apresenta uma região densa de célula leveduri-formes e uma superior que apresenta formas filamentosas menos densas. Estas células são fenotipicamente diferentes de células aderidas ou de células em suspensão (Al-Dhaheiri *et al*, 2008).

Estes biofilmes apresentam elevada resistência aos agentes microbianos, mas os mecanismos desta resistência em *C. albicans*, não estão totalmente compreendidos. No entanto pensa-se que a fraca penetração dos compostos na matriz do biofilme, deve-se às alterações fenotípicas resultantes da taxa de crescimento, à diminuição ou limitação de nutrientes e à expressão dos genes de resistência, induzidos pelo contacto com uma superfície (Al-Dhaheiri *et al*, 2008).

2.2.3) RESISTÊNCIA A FAGOCITOSE

A activação das defesas do hospedeiro depende de uma detecção apropriada dos agentes invasores. O mecanismo responsável pelo reconhecimento é mediado por receptores “pattern-recognition receptors” - PRRs que reconhecem as moléculas padrão dos agentes patogénicos “pathogen-associated molecular patterns” - PAMPs. O sistema de defesa inato é activado quando há o reconhecimento dos componentes da parede dos fungos (Veerdonk *et al*, 2008).

A primeira resposta antifúngica resulta num processo de fagocitose e/ou secreção de compostos microbiocidas, que secundariamente iniciam a produção de mediadores pro-inflamatórios como citocinas e quimiocinas. Quando o antigénio é apresentado desencadeia uma resposta imunitária de defesa adaptativa (Chai *et al*, 2009).

O papel de reconhecimento dos fungos patogénicos é realizado por várias classes de PRRs, em particular a família de proteínas designadas como “Toll-like receptors - TLRs” que são expressas em células imunes e não imunes. Na família TLR, a TLR2 e a TLR4 são as proteínas que apresentam maior acção no reconhecimento de *Candida*. A segunda classe de PRRs envolvida no reconhecimento de fungos são “C-type lectin receptors” (CLR). Recentemente foi demonstrado que a dectina-1, uma CLR, é um mediador de reconhecimento específico para os β -glucanos encontrados nas paredes

das células de *Candida* e *Aspergillus spp.* A dectina-1 e a TLR 2 podem colaborar no aumento da produção de citocinas pro-inflamatórias. A fagocitose de (blasto) conídios também pode ser mediada pela dectina-1 e pela TLR 2. Estas proteínas podem colaborar na promoção da fagocitose e na produção de citocinas e interleucinas (Heinsbroek *et al.*, 2005 ; Chai *et al.*, 2009).

As principais células do sistema imunitário inato do hospedeiro, responsáveis pela vigilância imunitária contra os fungos patogénicos são os neutrófilos circulantes, os monócitos e os macrófagos tecidulares. As células dendríticas estão envolvidas na apresentação de antígenos e ajudam a iniciação do sistema imunitário do hospedeiro. (Veerdonk *et al.*, 2008). Na defesa contra *Candida*, os neutrófilos são as células de defesa mais importantes, estando na linha da frente no combate a estes agentes. No entanto macrófagos e monócitos, também apresentam um papel importante na ausência de neutrófilos competentes (Chai *et al.*, 2009).

Os fungos patogénicos utilizam estratégias que lhes permitem ultrapassarem os mecanismos de defesa do hospedeiro, um importante mecanismo é evitar o reconhecimento dos seus antígenos de superfície (PAMPs) por parte dos PRRs. *C. albicans* é um fungo pleomórfico com capacidade para mudar o seu fenótipo de levedura para a forma filamentosa por acção das pressões ambientais. Com o fenótipo de levedura os β -glucanos estão expostos e são reconhecidos pela dectina-1, na forma filamentosa estes estão escondidos por componentes da parede, impedindo o seu reconhecimento. A dectina-1 também promove a actividade fungicida dos neutrófilos humanos, que tem um papel efectivo contra o fenótipo filamentoso de *C. albicans*. Acredita-se que o $\beta(1,3)$ -glucano da parede fúngica altera a sua estrutura antígenica para $\alpha(1,3)$ -glucano (não estimuladora do sistema imunitário) na forma filamentosa, incapacitando a dectina-1 de reconhecer os fungos na forma filamentosa. Nas células dendríticas as formas filamentosas induzem preferencialmente as T- helper cell type 2 (Th 2) em vez das T-helper cell type 1 (Th1) da resposta imunológica celular. Assim a resposta celular é diferente para a forma de levedura e para a filamentosa (d' Enfert, 2009; Chai *et al.*, 2009).

A activação de TLR2 ou TLR4 por parte dos fungos, leva à alteração da resposta pró ou anti-inflamatória das citocinas, sendo a indução das citocinas pró inflamatórias mais fraca em TLR2 do que em TLR4. O equilíbrio entre as Th1 e as Th2 é crítica para determinar o início da infecção, pois cada uma determina uma resposta imune distinta. A via da Th1 produz citocinas pró-inflamatórias como o IFN- γ (interferon γ). O IFN- γ induz uma resposta mediada por células necessária para a activação da fagocitose e da acção citotóxica, importante contra patógenos intracelulares e fúngicos. A via da Th2 induz

citoquinas como a IL-4, a IL-5 e a IL-10 (interleucinas) que estimulam a resposta humoral e inibem a resposta Th1 (resposta celular). Durante a resposta antifúngica, as citoquinas Th2 podem inibir a actividade dos monócitos e a sua acção tóxica. As formas filamentosas que invadem os tecidos preferem evitar a via de defesa TRL4 em favor de uma acção predominante das TRL2. Deste modo conseguem uma resposta Th2 maior, criando um desequilíbrio entre as vias de resposta Th1 e Th2 o que facilita o início da infecção (Chai *et al*, 2009); (Netea, *et al*, 2002). O equilíbrio entre as vias de resposta Th1 e Th2 é decisivo para as defesas do hospedeiro conseguirem eliminar o fungo patogénico. Este é um dos factores mais importantes, que levam à transição do estado comensal para o estado patogénico no fungo (Netea *et al*, 2002; Sampaio *et al*, 2010).

Outra estratégia de evasão do fungo ao sistema de vigilância imunitária e a fagocitose é a capacidade de se esconder em sítios estratégicos no hospedeiro, que podem ser células do hospedeiro sem capacidade fagocitária, como células epiteliais e células endoteliais. Nestas células o agente está protegido do ambiente externo hostil e das células com acção fagocítica. *C. albicans* consegue penetrar no interior das células não fagocíticas através do processo de endocitose por intermédio da proteína de superfície N-caderina (d' Enfert, 2009; Chai *et al*, 2009).

Há no entanto células fúngicas que, não conseguindo evitar a fagocitose pelas células imunitárias, conseguem sobreviver no interior destas. Algumas estirpes de *C. albicans* conseguem escapar a morte intracelular desenvolvendo hifas e conseguindo eventualmente escapar dos macrófagos. *C. albicans* possui ainda uma elevada capacidade de eliminar radicais livres de O₂ e transformar moléculas reactivas de azoto, tais como o óxido nítrico (NO) em moléculas menos tóxicas, produzidas por monócitos e macrófagos. A fagocitose induz a *C.albicans* no interior dos macrófagos, a adoptar um modo de hibernação para a auto preservação que consiste em baixar a sua velocidade de crescimento para uma forma mais lenta, numa utilização alternativa do carbono e uma resposta ao stress oxidativo, sendo a sua presença apenas declarada aquando da morte dos macrófagos. A actividade fagocitária só por si não é suficiente para conter o agente patogénico, tendo que ser reforçada por citocinas do tipo Th1 como o IFN- γ que tem a capacidade de eliminar de forma eficaz os microrganismos (Netea *et al*, 2002; Chai *et al*, 2009).

2.3) FOSFATASES

As fosfatases são hidrólases que utilizam como substrato fosfomonoésteres e que se encontram amplamente distribuídas na natureza tendo sido encontradas em animais,

vegetais e microrganismos. Estas enzimas estão divididas em 3 grupos principais: fosfatases alcalinas, fosfatases ácidas e fosfatases proteicas. As fosfatases ácidas apresentam pH ótimo para catálise em torno de 5, contrastando com as fosfatases alcalinas que apresentam um pH ótimo em torno de 9 e actuam em substratos de baixa massa molecular relativa (Aoyama *et al.*, 2003).

C. albicans apresenta fosfatases intracelulares e extracelulares, ambas são fosfatases ácidas. Estas foram uma das primeiras manoproteínas a serem caracterizadas. O seu papel na patogénese de *Candida* foi sugerido mas não confirmado (Chaffin *et al.*, 2008).

A fosfatase ácida de *C. albicans* é uma enzima induzida que foi purificada e homogeneizada. A enzima purificada é uma manoproteína com 125 a 130 kDa com pH ótimo de 3,6 a 4,5. A sua localização ou distribuição na estrutura da parede de *Candida albicans* é similar à fosfatase ácida de *S. cerevisiae*, uma enzima encontrada entre as camadas internas e externas da célula (Chaffin *et al.*, 1998).

As proteínas envolvidas na absorção de fosfato, são geralmente codificadas por genes que pertencem ao regulão Pho, estes genes são activados por transcrição em resposta à ausência de fosfato extracelular (Braibant *et al.*, 2001). A Pho100p é uma enzima induzida em pH ácido e baixas concentrações de fosfato. A expressão do gene PHO100 é induzida no início da formação dos biofilmes. Pho112p e Pho113p são fosfatases constitutivas e são ambas N glicosiladas. O gene PHO113 é regulado negativamente por Rim101p (Chaffin, 2008).

As proteínas fosfatases podem existir na forma solúvel, secretada ou ligadas à superfície exterior da membrana interna ou da parede celular.

2.3.1) ECTOFOSFATASES

A presença de fosfatases de superfície, que apresentam o local activo voltado para o meio extracelular, as chamadas ectofosfatases ou fosfatases extracitoplasmáticas, foi descrita em vários microrganismos. Nos fungos as ectofosfatases foram descritas como componentes de superfície nas espécies de *Candida*, *Saccharomyces cerevisiae*, *Sporothrix schenckii*, *Aspergillus fumigatus*, *Cryptococcus neoformans* e *Fonsecaea pedrosoi* (Kiffer-Moreira *et al.*, 2007). O conhecimento das funções desta proteína é ainda escasso, no entanto, de acordo com a sua natureza bioquímica e distribuição celular, estas enzimas podem proteger as células em condições ácidas por tamponamento do ambiente envolvente com fosfato inorgânico, regulando a disponibilidade do ortofosfato usado no metabolismo celular por hidrólise de fosfatos orgânicos (Kiffer-Moreira *et al.*,

2007). As fosfatases são componentes fundamentais em eventos celulares regulados por processos de fosforilação e desfosforilação que são coordenados e controlados por acção de proteínas quinases e fosfoproteínas fosfatases, no processo de reconhecimento de sinais internos e externos que activam respostas específicas, tendo um papel importante na diferenciação celular e na infecção do hospedeiro (Portela *et al*, 2010).

A actividade da ectofosfatase nos micélios de *Fonsecaea pedrosoi* é fortemente inibida pela adição exógena de fósforo, o que sugere que este produto de reacção pode regular a actividade da ectofosfatase fúngica. A depleção de fosfato do meio de cultura, aparentemente, induziu a expressão de ectofosfatases diferentes (Kneipp *et al.*, 2004).

Conídeos de *Fonsecaea pedrosi* que expressam uma alta actividade de fosfatases são significativamente mais aderentes às células epiteliais e fibroblastos do que aquelas que tem níveis basais de actividade desta enzima mais baixos (Kneipp *et al*, 2004).

Em *C. parapsilosis*, a actividade da fosfatase de superfície está correlacionada com a adesão fúngica a células animais, indicando que a ectofosfatase pode também influenciar as interacções das células fúngicas com as células do hospedeiro (Kiffer-Moreira *et al*, 2007).

Num estudo realizado por Portela e colaboradores (2010) verificou-se que, células fúngicas pré-tratadas com ortovanadato de sódio (inibidor das fosfatases) apresentavam uma inibição da capacidade de adesão do fungo, o que demonstra o envolvimento da ectofosfatase na adesão da *C. albicans* e consequentemente nos processos virulentos.

Os estudos mostram que para além das funções biológicas na célula fúngica, as ectofosfatases podem ter um papel importante na interacção com as células do hospedeiro porque a retirada de grupos de fosfato da superfície das células do hospedeiro pode resultar em alterações de configuração, expondo locais de interacção com os agentes infecciosos aos quais estas se podem ligar. Pensa-se que as ectofosfatases podem ter domínios de adesinas que promovam a ligação das células fúngicas ao hospedeiro semelhantes às adesinas microbianas (Kneipp *et al*, 2004).

A distribuição celular das ectofosfatases, juntamente com a sua capacidade para interferir nos processos fisiológicos através de remoção de grupos fosfatos das proteínas, suporta o papel destas moléculas durante a infecção das células do hospedeiro por fungos. Nas bactérias foi demonstrado que a desfosforilação das proteínas do hospedeiro pelas enzimas microbianas está associada com a virulência. A actividade de fosforilação da YopH, uma tirosina fosfatase, é um factor de virulência essencial produzido pelas espécies patogénicas de *Yersinia*, causando um bloqueio do processo fagocítico. Contudo em contraste com o que foi demonstrado para as infecções bacterianas, as moléculas

do hospedeiro utilizadas pelas ectofosfatases fúngicas como substratos ou receptores são ainda desconhecidas (Kiffer-Moreira *et al.*, 2007).

Mycobacterium bovis BCG expressa fosfatases de superfície, com um pico de actividade a valores de pH de 6, 10 e 12. No genoma completamente sequenciado de *Mycobacterium tuberculosis*, não foram encontrados genes capazes de produzir homologia significativa com as fosfatases ácidas e alcalinas das bactérias. Apenas dois produtos do gene, chamado Rv3310 e Rv2577, foram considerados homólogos a várias fosfatases de fungos e vegetais. Contrariamente à situação observada noutras bactérias, nenhuma das fosfatases identificadas em *Mycobacterium bovis* BCG era regulada pela concentração de fosfato do meio ambiente. Em bactérias, como *Escherichia coli* e *Bacillus subtilis*, a região promotora de genes que codifica os genes de fosfatase é compartilhada com outro promotor do regulão Pho, uma sequência consenso chamado Pho-Box. Essa sequência é reconhecida por uma proteína reguladora que activa a transcrição de genes a jusante, quando as bactérias necessitam de fosfato inorgânico (Braibant *et al.*, 2001).

A remoção de grupos de fosfato nas proteínas de superfície nas células do hospedeiro pode resultar em alterações estruturais levando a uma repulsão electrostática entre os fungos e as células epiteliais, podendo ainda expor sítios adicionais para a interacção com os agentes infecciosos. Em alternativa as ectofosfatases podem conter um domínio de adesina que pode promover directamente a ligação das células fúngicas ao hospedeiro, funcionando como as adesinas microbianas (Kiffer-Moreira *et al.*, 2007).

As sequências de polipeptídeos obtidas a partir de espécies relacionadas com *C. albicans* indicam a ocorrência de proteínas da parede fúngica (Ywp1; Pga24) que são reguladas por baixas concentrações extracelulares de fosfato e que têm homologia com as fosfatases ácidas (Kiffer-Moreira *et al.*, 2007).

Nos fungos a actividade das fosfatases é inibida pelos clássicos inibidores das fosfatases ácidas, tais como o ortovanadato de sódio, molibdato de sódio e fluoreto de sódio. O ortovanadato de sódio é o único que produz uma inibição irreversível. Células fúngicas de *C. albicans* pré-tratadas com o ortovanadato de sódio, apresentam uma inibição da sua capacidade de adesão as células humanas, o que confirma o papel das ectofosfatases na interacção da *C. albicans* com os tecidos do hospedeiro (Portela *et al.*, 2010).

3) OBJECTIVO DO ESTUDO

Este estudo teve como objectivo estudar a actividade das ectofosfatases em isolados clínicos de *C. albicans*, comparando a actividade intrínseca das ectofosfatases destas estirpes com fenótipo invasivo de acordo com o local de isolamento. Assim, foram comparadas estirpes isoladas a partir de situações de infecções invasivas e/ou sistémicas com estirpes isoladas a partir de infecções localizadas. As estirpes em estudo, depositadas na colecção de fungos patogénicos do Laboratório de Microbiologia da Faculdade de Medicina da Universidade de Coimbra, foram obtidas a partir de amostras clínicas de infecções locais ou sistémicas. Estudar as diferenças de actividade da ectofosfatase em função do meio extracelular e da temperatura (30°C e 37°C).

II- MATERIAL E MÉTODOS

1) DEFINIÇÃO DO OBJECTO DE ESTUDO

Este estudo decorreu de Outubro de 2010 a Outubro de 2011. As estirpes utilizadas pertencem à colecção de leveduras do Laboratório de Microbiologia da Faculdade de Medicina de Coimbra (FMC) e a sua origem foi o Cento Hospitalar de Coimbra (CHC) e os Hospitais da Universidade de Coimbra (HUC).

2) MATERIAIS E MÉTODOS

2.1) ESTIRPES E SUA PROVENIÊNCIA

As estirpes foram seleccionadas da Colecção de Leveduras patogénicas da Microbiologia da FMC tendo em conta o local de isolamento. Foram seleccionadas estirpes isoladas a partir de sangue, líquidos de locais estéreis, urina, exsudatos vaginais e fezes.

Para todas as estirpes foram colectados os dados referentes aos doentes, nos quais se isolaram as mesmas. A idade, o sexo, o serviço proveniente, a patologia de base, a origem do produto, o número de amostra na colecção do Laboratório de Microbiologia da FMC e o número de amostra no serviço de origem (CHC e HUC), foram utilizados para caracterizar as amostras.

2.1.1) MEIOS DE CULTURA E SOLUÇÕES

Os meios de cultura usados para o crescimento e a manutenção das estirpes foram preparados com água destilada.

O meio sólido de Yeast Extract-Peptone-Dextrose (YPD) usado para manter as estirpes foi preparado utilizando 0,5 % de extracto de levedura (peso /volume), 1% peptona (p/v), 2% de glicose (p/v), esterilizado e autoclavado a 121°C e a uma pressão atmosférica de 1,2 atm por 20 minutos e distribuído em placas de Petri.

O meio líquido de YPD foi preparado utilizando 1% de extracto de levedura, 1% de peptona e 2% de glicose 2% para um volume final de 10ml.

O meio RPMI 1640 (Sigma) foi suplementado com 10% de soro fetal bovino (FBS) inactivado, com 23,8 mM de Bicarbonato de Sódio e com 50mM de glicose.

O Tampão Citrato foi preparado com 0,09 M e pH 4,8.

2.1.2) CONDIÇÕES DE CRESCIMENTO

As estirpes, mantidas a -80°C, foram descongeladas e semeadas em meio sólido YPD, incubadas a 30°C durante 24 - 48 horas e guardadas a 4°C até serem usadas. Antes de qualquer ensaio, estas culturas foram transferidas para meio líquido, em balões Erlenmeyer e incubadas durante 18 - 24 horas. A incubação foi feita a 30°C em agitação orbital constante de 180 rpm num agitador orbital (INFORS AG CH-403 BOTTMINGEN).

2.2) MEDIÇÃO DA ACTIVIDADE ENZIMÁTICA DA ECTOFOSFATASE

O método usado para quantificação da actividade de ectofosfatase, foi baseado no descrito por Kiffer-Moreira e colaboradores (2007), usando o Kit Acid Phosphatase Assay Kit (Sigma Aldrich).

As estirpes seleccionadas de *C. albicans* foram colocadas em meio líquido YPD e incubadas 18 - 24h, a 30° C sob agitação orbital a 180 rpm. As células foram contadas em câmara de Neubauer para quantificação. Retiraram-se 500 µl de cada cultura e centrifugou-se a 5000 rpm, 5 min a 4°C. Descartou-se o sobrenadante, suspendeu-se o sedimento em 1ml de tampão PBS e centrifugou-se. Novamente foi desprezado o sobrenadante e o sedimento foi ressuspenso em 600 µl de tampão PBS. Esta suspensão, foi misturada na proporção de 1:1, em eppendorfs contendo o meio de cultura desejado (YPD e RPMI), e incubadas durante 1h30m a 30°C e a 37°C. De seguida todas as suspensões foram centrifugadas a 5000 rpm, 5 min a 4°C. O sobrenadante foi descartado e o sedimento suspenso em 1ml de tampão citrato, centrifugado e o sedimento ressuspenso em 300µl de tampão citrato.

As amostras suspensas em tampão citrato foram diluídas a 1/2 e a 1/5. Numa placa de 96 poços foram colocados 50 µl de amostra não diluída e de cada diluição em duplicado em contacto com 50 µl de substrato (p-nitrofenil fosfato). O padrão foi feito colocando 300 µl de solução Padrão (Solução de p-Nitrophenol a 10 mM) em triplicado. O controlo positivo foi realizado adicionando 50 µl de enzima de controlo (fosfatase ácida) e 50 µl de substrato (p-Nitrofenil fosfato). Foi também preparado um branco em triplicado colocando 50 µl de substrato e 50 µl de Tampão fosfato. A placa foi incubada durante 5 min. a 37°C. A actividade da enzima foi parada adicionando 200 µl de NaOH a 2% às amostras, ao controlo positivo e ao branco.

A actividade das ectofosfatases foi medida nas amostras (sem diluição, diluição a 1/2 e diluição a 1/5) no branco, no padrão e no controlo positivo. As leituras foram realizadas num espectrofotómetro Spectra plus (Molecular Devices) a um comprimento de onda (λ) de 405 nm.

A actividade da fosfatase foi calculada utilizando a equação seguinte (de acordo com as instruções do fabricante):

$$\text{Unidades/ml} = \frac{(A_{405} [\text{amostra}] - A_{405} [\text{branco}]) \times 0.05 \times 0,3 \times \text{FD}}{A_{405} [\text{padrão}] \times \text{tempo} \times \text{Venz}}$$

Onde: **A₄₀₅ (amostra)** é igual a absorvância da amostra, **A₄₀₅ (branco)** é igual a absorvância do branco, **A₄₀₅ (padrão)** é igual a absorvância do padrão, **FD** é igual a factor de diluição da amostra original, **Tempo** é igual ao tempo de incubação a 37° C em minutos, **Venz** é igual ao volume de enzima adicionada ao ensaio em ml, **0,05** é a concentração (μmole/ml) de p – nitrofenol na solução padrão, **0,3** é o volume total do ensaio na placa de 96 poços (0,3ml), incluindo a solução de paragem e **Unidade** é uma unidade de fosfatase ácida, quantidade de enzima que hidrolisa 1μmole de p – nitrofenil fosfato por minuto a pH 4.8 e a 37°C.

O valor obtido com base nesta equação foi depois normalizado de acordo com a contagem do número de células no ensaio, para 10⁷ células.

2.3) TRATAMENTO DE DADOS

O tratamento dos dados foi feito utilizando o programa informático Access, Excel e com GraphPad Prism. A significância estatística entre grupos foi determinada utilizando o teste ANOVA com significância para valores de $p < 0,05$.

1) RESULTADOS

Este estudo foi realizado no período de Outubro de 2010 a Outubro de 2011. Foram estudadas 33 estirpes de *C. albicans* guardadas na colecção da Faculdade de Medicina de Coimbra provenientes de doentes do C.H.C. e dos HUC.

3.1) CARACTERIZAÇÃO DA AMOSTRA

3.1.1) PROVENIÊNCIA DAS ESTIRPES

As estirpes estudadas, foram caracterizadas utilizando o número destas na colecção de fungos patogénicos, indicando o produto de origem, a idade e a informação clínica de acordo com a tabela nº1.

Tabela I: Caracterização das estirpes em estudo

Nº colecção	Produto	Doente	
		Idade	Patologia
YP0537	Sangue	26	Abcesso pélvico/C. Cólon
YP0569	Sangue	55	C. Pâncreas
YP0577	Bílis	2	Pré -TRH
YP0581	Bílis	2	Pré -TRH
YP0631	Sangue	61	Pneumonia
YP0667	Liq. abdominal	41	Perfuração Intestinal+colectomia
YP0680	P. Cateter	78	Pneumonia
YP0683	P. Cateter	49	Pneumonia
YP0704	Bílis	7	TRH
YP0723	Bílis	7	TRH
YP0724	Bílis	7	TRH com fístula biliar
YP0731	Bílis	7	TRH com fístula biliar
YP0732	Urina	77	ITU
YP0735	Urina	75	Pneumonia nosocomial
YP0742	Urina	74	Febre
YP0760	Sangue	83	S. Febril
YP0798	Liq. peritonal	12	Perfuração em diverticulo gastrico
YP0801	Sangue	48	seq tub+sarcoidose
YP0823	Ex. Vaginal	37	Gravidez
YP0830	Ex. Vaginal	38	Gravidez+ leucorreia
YP0831	Sangue	75	C. pâncreas+ febre
YP0833	Fezes	48	Abcesso hepático
YP0846	P. cateter	75	Pneumonia
YP0861	Liq. ascítico	53	Cirrose hepática
YP0902	Ex. Vaginal	18	Leucorreia
YP0919	Liq. Pleural	80	Pneumonia
YP0936	P. cateter	10	Febre
YP0940	Bílis	52	Biloma após colicistite
YP0972	Fezes	10	TRH
YP1016	Sangue	82	Inf. resp/ pancreatite
YP1025	Liq. não especificado	8	Transplante
YP1130	Sangue	36	Sepsis/Peritonite
Yp1131	Liq peritonal	83	Peritonite

3.1.2) IDADE

A população compreendida neste estudo, e a partir da qual foram obtidos os isolados de *C. albicans* apresentava uma idade compreendida entre os 2 e os 83 anos, sendo a média de idades de 43,5 anos apresentando um desvio padrão de 28,92.

A distribuição do número total de estirpes (33) por escalão etário encontradas no estudo foi a seguinte: para o escalão dos 0 aos 3 é de 2 estirpes, no escalão 4 aos 18 é de 9 estirpes, no escalão dos 19 a 64 anos é de 12 estirpes e no escalão etário superior aos 65 anos é de 10 estirpes. (Figura 1).

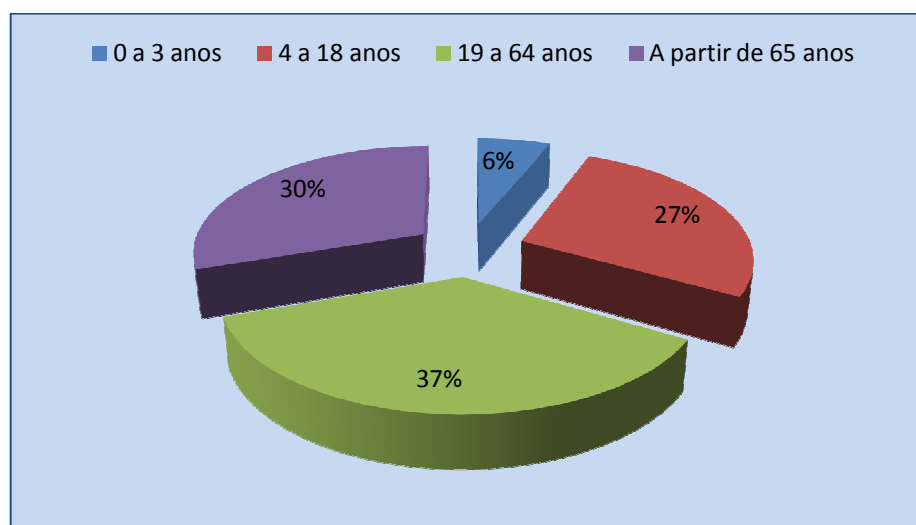


Figura 1: Distribuição de estirpes de acordo com os escalões etários dos doentes onde foram isoladas.

3.1.3) GÉNERO

Das 33 estirpes estudadas, verificou-se uma distribuição semelhante entre ambos os géneros, sendo 48% para o sexo feminino e 52% para o masculino (Figura 2).

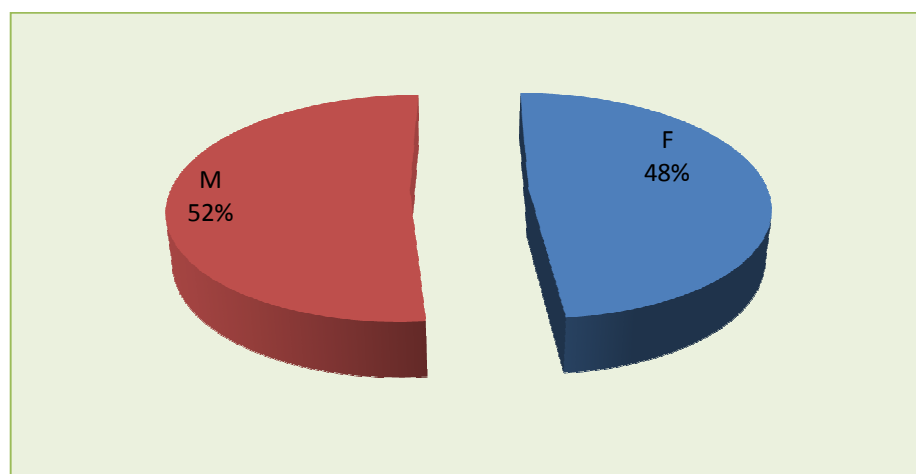


Figura 2: Distribuição de estirpes de acordo com o género dos doentes de onde foram isoladas.

3.1.4) AMOSTRAS CLÍNICAS

As estirpes foram classificadas quanto a sua origem, sendo a maior percentagem de estirpes, representada pelos líquidos de locais estéreis (excepto sangue) com 13 estirpes, 8 estirpes provenientes do sangue, 4 estirpes isoladas a partir de pontas de cateter, 3 estirpes de urina, 3 de exsudados vaginais e 2 estirpes de fezes (Figura 3).

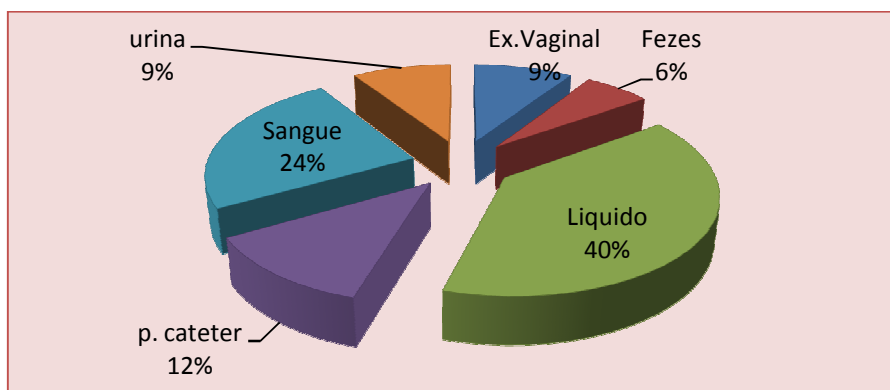


Figura 3: A percentagem de estirpes por produto de onde foram isoladas

3.1.5 FACTORES DE RISCO/PATOLOGIA DE BASE

A população estudada foi caracterizada a partir de informação fornecida pelo Laboratório de Microbiologia do CHC e HUC. Das estirpes, 8 pertenciam a doentes que sofreram transplante hepático ou apresentavam-se em fase de pré-transplante, 7 a doentes com patologia respiratória, 3 a doentes com sepsis, 4 a doentes com patologia oncológica, 2 a doentes com patologia do trato urinário, 1 a doente com patologia gastrointestinal, 2 a doentes com patologia hepática, e 1 a um doente com uma infecção mista, 2 a doentes com infecção abdominal, 1 doente com patologia ginecológica. Dois dos isolados foram obtidos em grávidas (Figura 4).

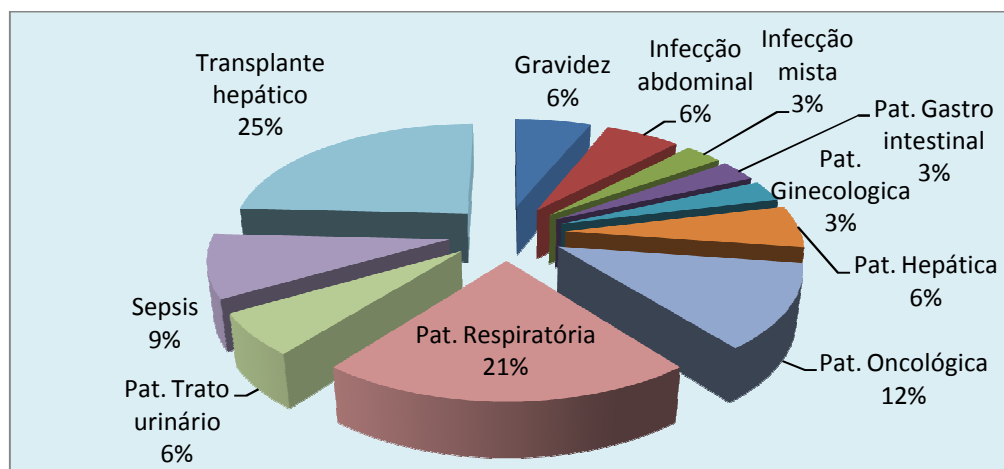


Figura 4: A percentagem de estirpes por patologia base dos doentes.

3.2) ACTIVIDADE ENZIMÁTICA DA ECTOFOSFATASE

A quantificação da actividade enzimática de ectofosfatases em *C. albicans* foi realizada em várias condições, tal como descrito na secção de Materiais e Métodos. Utilizaram-se dois meios de cultura, YPD e RPMI 1640, sendo que, este último, por ser suplementado com soro pretendia simular condições que as células fúngicas encontram quando em situação de infecção. Também as duas temperaturas utilizadas pretendem simular as condições de crescimento laboratorial, 30°C, mais próximo da temperatura óptima de crescimento, e condições fisiológicas, 37°C (figura 5).

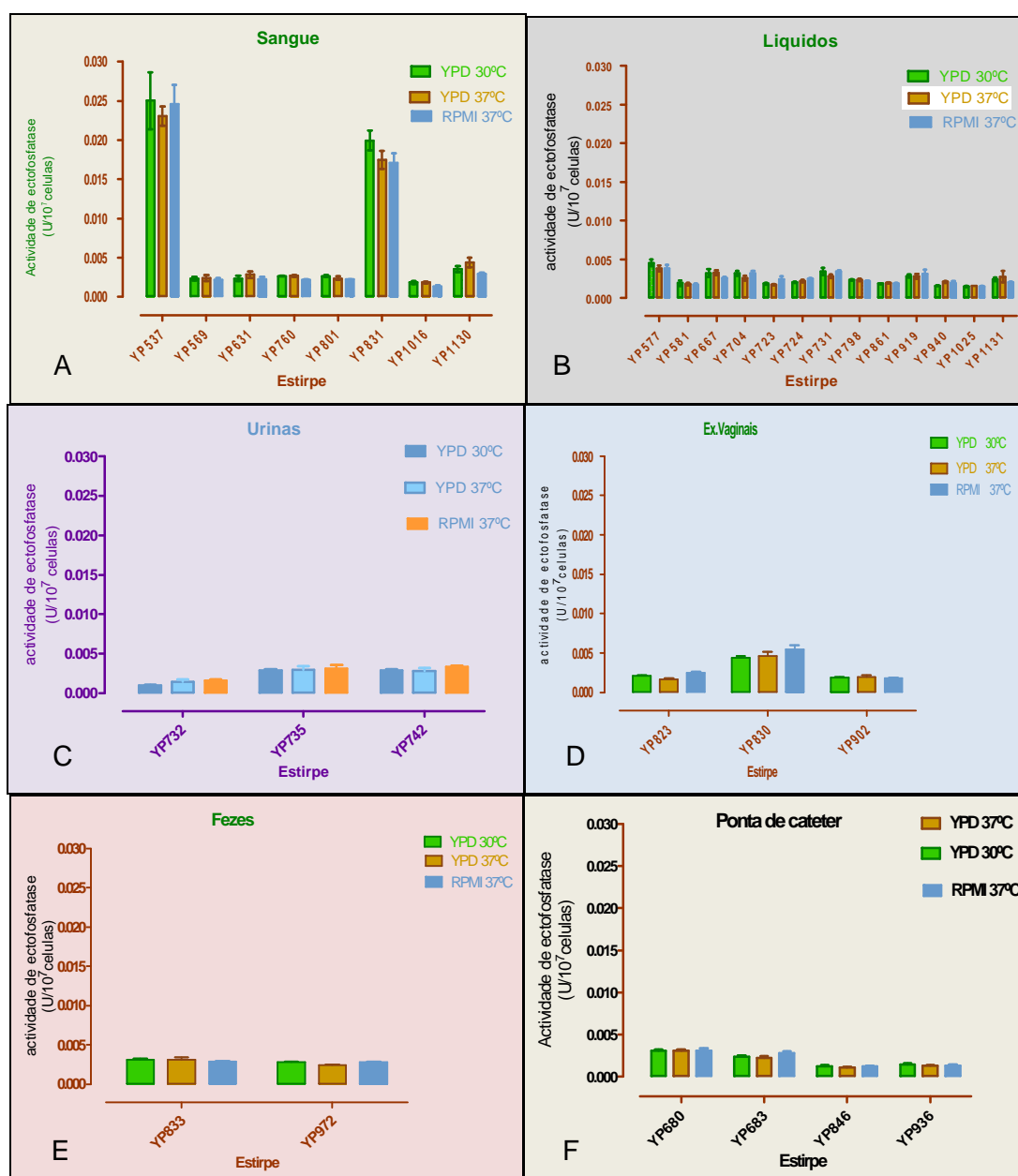


Figura 5: Determinação da actividade da ectofosfatase. As células fúngicas foram incubadas com meio YPD a 30°C e a 37°C e meio RPMI 1640 suplementado com FBS a 37°C durante 1h30 min. Após o período de incubação a reacção foi parada e a actividade enzimática foi medida. Valores médios e respectivos desvios padrão. A) Sangue; B) Líquidos; C) Exsudados vaginais; D) Urinas; E) Fezes; F) Pontas de cateter.

3.2.1) IDADE

Verificou-se que as estirpes que apresentam maior actividade enzimática são as que pertencem ao grupo etário dos 19 aos 64 anos, seguido dos 0-3 anos não havendo diferenças significativas entre as diferentes condições de teste (Figura 6).

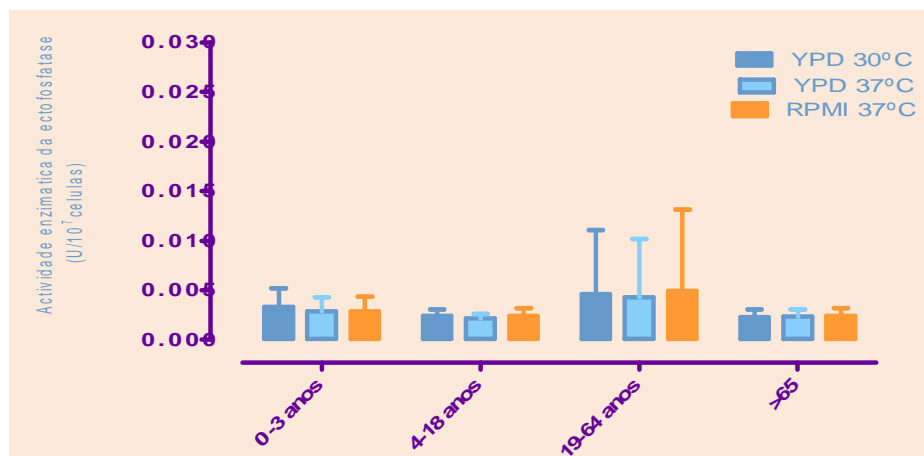


Figura 7: Valores médios de actividade de ectofosfatase por escalão etário dos doentes e desvio padrão.

3.2.2) GÉNERO

No que respeita à média de actividade de ectofosfatase por condição de teste e por géneros os valores são semelhantes (Figura 7).

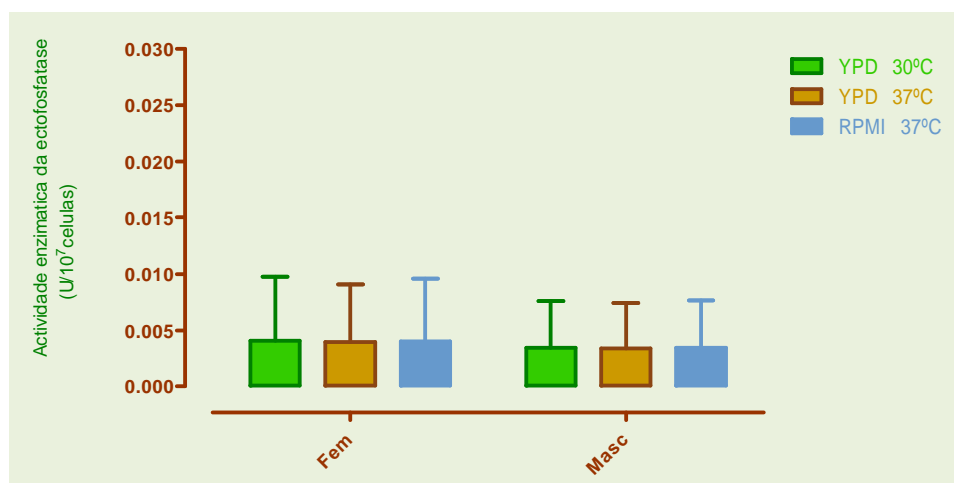


Figura 8: Médias de actividade da ectofosfatase por géneros do doente e por condição de teste.

3.2.3) PRODUTOS

A análise das actividades enzimáticas, de acordo com o produto a partir dos quais as estirpes foram obtidas, mostrou que no sangue essa actividade era significativamente maior do que nas outras amostras. Assim, o valor obtido em estirpes isoladas de sangue é em média (considerado os resultados obtidos nas 3 diferentes condições de ensaio) de $0,007 \text{ U}/10^7$ células enquanto para as estirpes isoladas de outros produtos o valor médio observado foi de $0,002 \text{ U}/10^7$ células (Figura 8).

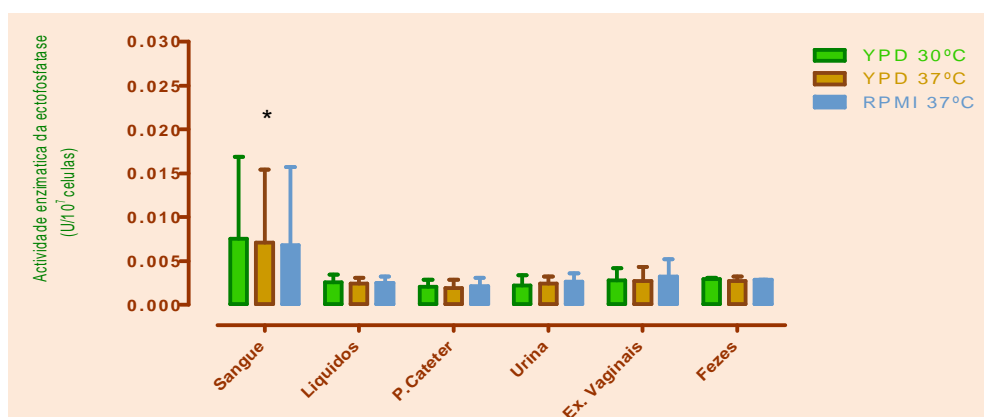


Figura 9: Distribuição das médias de actividade de ectofosfatase para cada condição teste por produto e desvio padrão * $P < 0,05$. Os valores de actividade enzimática no sangue são significativamente mais altos.

3.2.4) FACTORES DE RISCO (PATOLOGIA DE BASE OU CONDIÇÃO FISIOLÓGICA)

As estirpes que apresentaram valores mais elevados de actividade enzimática foram as isoladas de doentes com patologia oncológica (Figura 9). Neste grupo (representado por 4 doentes) o valor médio obtido foi de cerca de $0,012 \text{ U}/10^7$ células, enquanto o valor médio para os outros produtos foi de $0,002 \text{ U}/10^7$ células.

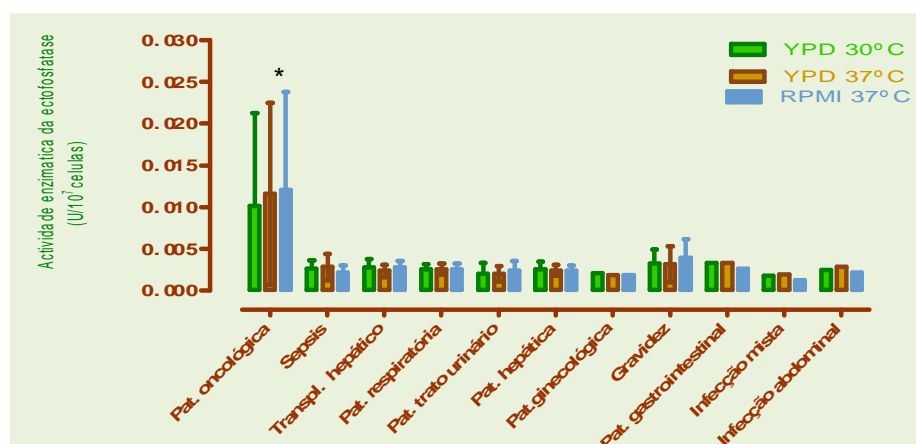


Figura 10: Média da actividade de ectofosfatase por patologia e desvios padrão. * $P < 0,05$. A patologia oncológica apresenta valores significativamente mais elevados.

DISCUSSÃO

Este trabalho teve como objectivo determinar o papel da ectofosfatase como factor de virulência de *Candida albicans*. Desde que actividades enzimáticas elevadas de ectofosfatase foram associadas a estirpes que apresentavam uma alta patogenicidade (Kiffer-Moreira *et al.*, 2007; MacCallum *et al.*, 2009), que estas tem sido estudadas.

C. albicans é o agente mais frequente de candidíase no homem. É um fungo que pode existir como comensal ou como oportunista dependendo do estado de saúde do hospedeiro. Na maioria dos indivíduos, ela faz parte da flora residencial e existe como comensal no tracto gastrointestinal, no trato genital e urinário. Contudo em hospedeiros imunocomprometidos, ela tem a capacidade de colonizar vários tecidos e causar uma grande variedade de doenças (Tuite *et al.*, 2004).

É importante, realçar o facto de provavelmente as informações clínicas usadas para caracterizar a amostra, não estarem completas por terem sido retirados da base de dados fornecida pelo Laboratório de Microbiologia do CHC e dos HUC, visto que muitas vezes os clínicos, não fornecem informações completas e uniformes aos laboratórios, o que dificulta a avaliação dos dados, esta situação, já foi descrita noutros estudos (Paulo *et al.*, 2009).

Neste estudo testamos estirpes de *C. albicans* em três ambientes distintos, que pretendiam representar as condições que estas encontram no corpo humano a 37°C quando, se encontram a causar doença invasiva e a 30°C quando, se encontram a colonizar a pele. Não foi observado qualquer aumento significativo de actividade enzimática com o aumento de temperatura de 30°C para 37°C, tal como foi descrito por Collopy-Junior e colaboradores (2006) para o *C. neoformans*. Estes autores não obtiveram diferenças de actividade enzimática das ectofosfatases a diferentes temperaturas (30°C, 37°C, 40°C e 45°C) mas observaram variações consideráveis de níveis actividade entre as estirpes. Também no nosso estudo as diferentes estirpes usadas apresentaram diferenças de actividade. Não se observaram alterações significativas de actividade de ectofosfatase aquando da utilização do meio de cultura base para fungos, YPD, e do meio mais rico, o RPMI suplementado com soro fetal bovino, que, pretendiam representar o meio ambiente e as condições do corpo humano respectivamente.

O presente estudo, revelou que os valores médios de actividade enzimática das ectofosfatases variavam em função da idade do doente a partir do qual a estirpe foi isolada. Pensa-se que a idade será um factor importante, visto que o sistema imunitário humano sofre alterações ao longo da vida. No entanto, quando se observou o intervalo dos 19 aos 64 anos, verificou-se que os valores médios se encontravam muito elevados,

mas como o desvio padrão é elevado, significa que existem valores muito diferentes entre si. Esta grande dispersão de resultados deve-se em particular, a um caso de abscesso pélvico, numa mulher de 26 anos, com diagnóstico de carcinoma do cólon e com cirurgia abdominal de remoção. Neste caso, o valor mais elevado de actividade de ectofosfatase foi obtido de uma estirpe isolada do sangue. Reconhecesse actualmente no homem, tal como noutras espécies que o sistema imunitário vai perdendo competências com a idade, processo designado por Imunosossenêscia, e que leva a um aumento da incidência de infecções, neoplasias e doenças auto-imunes (Aw *et al.*, 2007), assim a partir dos 65 anos de idade o sistema imunitário sofre uma remodelação complexa e contínua, em que algumas funções são reduzidas e outras são mantidas ou aumentadas. No entanto no grupo etário de maiores de 65 anos, não se observaram valores muito elevados de actividade de ectofosfatase como seria de esperar.

Quando observamos os resultados em relação ao género, verificamos valores ligeiramente mais altos de actividade de ectofosfatase, mas não significativos para o género feminino, no entanto, em estudos epidemiológicos verifica-se que a fungémia é mais frequente em homens do que em mulheres podendo estar relacionado com o facto de o número de homens que entra nas unidades de cuidados intensivos ser maior, conforme referido por Costa-de-Oliveira e colaboradores (2007).

Quanto a origem das estirpes, onde foram encontrados valores médios mais elevados de actividade de ectofosfatase foi em estirpes isoladas a partir do sangue. Estes valores justificam-se por se tratar de um meio líquido estéril, bastante nutritivo e em permanente contacto com todos os órgãos do corpo. A presença de fungos (*C. albicans*), não deixa dúvidas da existência de uma infecção generalizada, podendo atingir todos os órgãos do corpo e levar a sepsis, falência multiorgânica ou mesmo a morte. A sua capacidade de adaptação ao meio envolvente permite-lhe ultrapassar os mecanismos de defesa do hospedeiro (Chai, *et al.*, 2009). Nestas circunstâncias, o fungo apresenta todas as suas características de patogenicidade, confirmando assim que a ectofosfatase é um factor de virulência porque sua actividade está aumentada. Os resultados obtidos induzem a pensar que o sucesso da infecção por estirpes de *Candida* está dependente das condições do hospedeiro e do local da infecção. As estirpes quando adquirem competências manifestam-nas independentemente das condições que se tentam recriar em laboratório para simular o ambiente existente no corpo humano, uma vez que os resultados obtidos, nas três condições de teste foram semelhantes entre si para cada estirpe. As estirpes isoladas a partir de outros locais de infecção apresentaram valores muito semelhantes. As estirpes com origem em pontas de cateter, apresentam os valores mais bai-

xos, o que pode justificar-se pelo facto de existir, nestes locais uma colonização por parte de fungos. A aplicação de cateteres é uma porta de entrada de microrganismos, devido a quebra de continuidade da superfície epitelial, podendo haver formação de biofilmes ou colonização nestes locais, não havendo infecção. Os biofilmes actuam como uma barreira contra antimicrobianos, permitindo a sobrevivência e adaptação genética da *Candida spp.* (Chai *et al* 2009). Quanto à urina, podemos estar numa situação em que pode ocorrer colonização da zona vaginal, sendo os fungos arrastados aquando da colheita da urina para análise, daí os valores se apresentarem baixos.

Em relação as estirpes provenientes de diferentes patologias encontraram-se valores mais elevadas de actividade de ectofosfatase nas estirpes que tiveram origem em doentes com patologia oncológica (o produto de origem, verificou-se que se tratava de sangue). Tal como referido por Zaoutis e colaboradores (2010), pacientes com carcinomas têm um claro aumento do risco de sofrerem candidémia, devido ao seu estado imunocomprometido. Esta associação permite dizer que a quebra na imunidade e a terapia a que estes indivíduos são submetidos facilita a instalação destes microrganismos, uma vez que a imunodeficiência ou imunossupressão permite que a candidíase invasiva se torne uma doença potencialmente fatal (Vilanova *et al.*, 2004). Pensa-se que, a presença da *C. albicans* no sangue poderá levar a uma situação de sepsis, caso não seja detectada atempadamente. Está descrito que doentes com doença neoplásica têm um claro aumento de risco de candidémia. O estado de depressão do sistema imunitário destes doentes, as alterações das mucosas gastrointestinais resultantes da acção de fármacos quimioterápicos e citotóxicos bem como as alterações da flora intestinal, causada pela acção da profilaxia antimicrobiana, cria condições para que as leveduras invadam a circulação mesentérica (Zaoutis *et al*, 2010), logo estes dois factores, contribuem para o aumento de risco de candidémia, o que está em consonância com os resultados obtidos neste estudo.

CONCLUSÃO

Candida albicans é um fungo pleomórfico, que pode existir como comensal ou como patogénico. Os mecanismos de defesa de hospedeiros imunocompetentes são geralmente eficientes contra os fungos patogénicos. No entanto quando a integridade do sistema imune inato é quebrada, os fungos são oportunistas e causam doença. A capacidade dos fungos para ultrapassar os mecanismos de defesa é decisiva para a instalação da doença.

Actualmente os fungos apresentam-se como a quarta e terceira causa de infecções sanguíneas e urinárias respectivamente, associadas aos cuidados de Saúde.

O sangue representa o local de eleição dos fungos para causar infecção, quando temos uma falha de continuidade ou uma baixa nas defesas imunitárias. Os fungos e em particular *C. albicans* instalam-se e utilizam todos os seus factores de virulência para causar doença generalizada. Podemos verificar no nosso estudo que a actividade de ectofosfatase é um desses factores pois detectamos, em estirpes isoladas deste produto uma actividade enzimática muito elevada, particularmente quando estamos em presença de doença oncológica.

Conclui-se que o valor de actividade das ectofosfatases está dependente das condições de imunidade do hospedeiro e do local de instalação da infecção, visto que os valores mais elevados são apresentados por estirpes isoladas do sangue de hospedeiros que apresentavam baixa defesa imunitária devido a sua patologia de origem oncológica.

BIBLIOGRAFIA

- Al-Dhaheri, R. S., & Douglas, J. L. (2008). Absence of Amphotericin B-tolerant persister cells in biofilms of some *Candida albicans* species. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* , 52, 1884-1887.
- Álvares, C. A., Svidzinski, T. I., & Consolaro, M. E. (2007). Candidiase vulvovaginal: fatores predisponentes do hospedeiro e virulência das leveduras. *Jornal Brasileiro de Patologia e Medicina Laboratorial* , 43, 319-327.
- Aoyama, H., Silva, T. M., Miranda, M. A., & Ferreira, C. V. (2003). Proteínas tirosina fosfatases: Propriedades e funções biológicas. *Quim. Nova* , 26 , 896-900.
- Aw, D., Silva, A. B., & Palmer, D. B. (2007). Immunosenescence: emerging challenges for an ageing population. *Immunology* , 120, 435–446.
- Blyth, C. C., Chen, S. C., Slavin, M. A., Serena, C., Nguyen, Q., Marriot, D., et al. (2009). Not little adults:candidemia epidemiology,molecular characterization,and antifungal susceptibility in neonatal and pediatric patients. *Pediatrics* , 123, 1360-2368.
- Braibant, M., & Content, J. (2001). The cell surface associated phosphatase activity of *Mycobacterium bovis* BCG is not regulated by environmental inorganic phosphate. *FEMS Microbiology Letters* , 195, 121-126.
- Chaffin, W. L. (2008). *Candida albicans* Cell Wall Proteins. *Microbiology and Molecular Biology Reviews* , 72 , 495-544.
- Chaffin, W. L., López-Ribot, J. L., Casanova, M., Gozalbo, D., & Martínez, J. P. (1998). Cell Wall and Secreted Proteins of *Candida albicans*: Identification, Function, and Expression. *Microbiology and Molecular Biology Reviews* , 62 , 130–180.
- Chai, L. Y., Netea, M. G., Slavin, M. A., & Kullberg, B. J. (2009). Fungal strategies for overcoming host innate immune response. *Medical Mycology* , 47, 227-236.
- Collopy-junior, I., Esteves, F. F., Nimrichter, L., Rodrigues, M. L., Alviano, C. S., & Meyer-Fernandes, J. R. (2006). An ectophosphatase activity in *Cryptococcus neoformans*. *Federation Of European Microbiological Societies* , 6, 1010-1017.
- Costa-de-Oliveira, S., Pina-Vaz, C., Mendonça, D., & Rodrigues, A. G. (2008). A first portuguese epidemiological survey of fungaemia in a university hospital. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis* , 27, 365-374.
- d' Enfert, C. (2009). Hidden Killers: persistence of opportunistic fungal pathogens in human host. *Current opinion in Microbiology* , 12, 358-364.
- Garcia, M. S. (2006). Clinical spectrum of invasive candidiasis in critically ill non-neutropenic patients. *Revista Iberoamericana Micologia* , 23, 8-11.

Gokce, G., Cerikcioglu, N., & Yagci, A. (2007). Acid proteinase, phospholipase, and biofilm production of *Candida* species isolated from blood cultures. *Mycopathologia* , 164, 265–269.

Heinsbroek, S. E., Brown, G. D., & Gordon, S. (2005). Dectin-1 escape by fungal dimorphism. *Trends in Immunology* , 26, 352-354.

Kiffer-Moreira, T., Pinheiro, A. A., Alviano, W. S., Barbosa, F. M., Souto-Pradrón, T., Nimrichter, L., et al. (2007). An ectophosphatase activity in *Candida parapsilosis* influences the interaction of fungi with epithelial cells. *FEMS Yeast Research* , 7, 621–628.

Kneipp, L. F., Rodrigues, M. L., Holandino, C., Esteves, J. F., Souto-Pradrón, T., Alviano, C. S., et al. (2004). Ectophosphatase activity in conidial forms of *Fonsecaea pedrosoi* is modulated by exogenous phosphate and influences fungal adhesion to mammalian cells. *Microbiology* , 150, 3355–3362.

LaFleur, M. D., Kumamoto, C. A., & Lewis, K. (2006). *Candida albicans* Biofilmes Produce Antifungal-Tolerant Persister Cells. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* , 50, 3839-3846.

MacCallum, D. M., Castillo, Luis., Nather, Kerstin., Munro, Carol A., Brown, Alistair J.P., Gow, Neil A. R., Odds, Frank C. (2009). Property differences among the four major *Candida albicans* strain clades. *Eukaryotic cell*, 8, 373-387.

Netea, M. G., Van der Graaf, C. A., Vonk, A. G., Verschueren, I., Van der Meer, J. W., & Kullberg, B. J. (2002). The role of Toll-Like Receptor (TLR)2 and TLR4 in host defense against disseminated candidiasis. *The Journal of Infectious Diseases* , 185, 1483-1489.

Nobile, C. J., Scheineider, H. A., Nett, J. E., Sheppard, D. C., Filler, S. G., Andes, D. R., et al. (2008). Complementary adhesion function in *C. albicans* biofilm production. *Current Biology* , 18, 1017-1024.

Ombrellá, J. A., Racca, L., & Ramos, L. (2008). Actividades proteinasa y fosfolipasa de aislamientos de *Candida albicans* provenientes de secreciones vaginales con distintos valores de pH. *Revista Iberoamericana de Micología* , 25, 12-16.

Paulo, C., Mourão, C., Veiga, P. M., Marques, J. M., Graça, R., F., A. A., et al. (2009). Retrospective analysis of clinical yeast in a hospital in the centre of Portugal: spectrum and revision of the identification procedures. *Medical Mycology* , 47, 836-844.

Portela, M. B. (2006). <http://ged1.capes.gov.br>. Obtido em 04 de Dezembro de 2010, de <http://ged1.capes.gov.br/WCMain.html>: http://ged1.capes.gov.br/CapesProcessos/926742-ARQ/926742_6.PDF

Portela, M., Kneipp, L., Souza, I. R., Holandino, C., Alviano, C., Meyer-Fernandes, J., et al. (2010). Ectophosphatase activity in *Candida albicans* influences fungal adhesion: study between HIV-positive and HIV-negative isolates. *Oral Diseases* , 16, 431–437.

Sampaio, P., Santos, M., Correia, C., Amaral, F. E., Chavez-Galarza, J., Costa-de-Oliveira, S., et al. (2010). Virulence attenuation of *Candida Albicans* genetic variants

isolated with a recurrent bloodstream infection. *PloS ONE* , 5, e10155
doi:101371/journal.pone.0010155.

Tsang, C. S., Chu, F. C., Leung, W. K., Jin, J. L., Samaranayake, L. P., & Siu, S. C. (2007). Phospholipase, proteinase and haemolytic activities of *Candida albicans* isolated from oral cavities of patients with type 2 diabetes mellitus. *Journal of Medical Microbiology* , 56, 1393–1398.

Tuite, A., Mullick, A., & Gros, P. (2004). Genetic analysis of innate immunity in resistance. *Genes and Immunity* , 5, 576–587.

Vediyappan, G., Rossignol, T., & d'Enfert, C. (2010). Interaction of *Candida albicans* Biofilms with Antifungals: Transcriptional Response and Binding of Antifungals to Beta-Glucans. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* , 54, 2096–2111.

Veerdonk, F. L., Kullberg, B. J., Meer, J. W., Gow, N. A., & Netea, M. G. (2008). Host–microbe interactions: innate pattern recognition of fungal pathogens. *Current Opinion in Microbiology* , 11, 305–312.

Vilanova, M., Teixeira, L., Caramalho, I., Torrado, E., Marques, A., Madureira, P., et al. (2004). Protection against systemic candidiasis in mice immunized with secreted aspartic proteinase 2. *Immunology* , 111, 334–342.

Zaoutis, T. E., Prasad, P. A., Localio, A. R., Coffin, S. E., Bell, L. M., & Walsh, T. J. (2010). Risk factors and predictors for candidemia in pediatric intensive care unit patients: implication for prevention. *Clinical Infectious Diseases* , 51, e 34 - e 45.

.